

DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* ISOLADOS DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO¹

Rafaella da Rocha Soletti², Sandra Maria Ferraz³

¹Vinculado ao projeto “Sanidade Animal”

²Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV/UDESC – Bolsista PROBIC/CNPq

³Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC – sandra.ferraz@udesc.br

O queijo artesanal serrano é um produto típico da região da Serra Catarinense e se caracteriza por ser produzido em propriedades rurais, a partir de leite cru. No entanto, há inúmeros relatos na literatura sobre a ocorrência de micro-organismos patogênicos em queijos artesanais. A contaminação microbiana desses alimentos assume grande relevância para a saúde pública, já que o consumo desse produto contaminado pode desencadear intoxicações e toxinfecções alimentares em consumidores. Dentre os principais micro-organismos encontrados nesses alimentos está *Escherichia coli*, considerado um potencial agente patogênico caracterizado pela produção de enterotoxinas. Além disso, outro fator de suma importância para a saúde pública é a presença de cepas de *E. coli* que apresentam multirresistência aos antimicrobianos, já que estas tornam as infecções alarmantes e de difícil tratamento. Um dos mecanismos de resistência desenvolvido pelas *E. coli* é a hidrólização do anel beta-lactâmico, mecanismo chamado de ESBL (“extended-spectrum beta-lactamases”), conferindo resistência aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, os quais incluem penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Apesar desse mecanismo não se aplicar aos carbapenêmicos (principal classe de antimicrobianos nos casos de infecção bacteriana em humanos), já existem estudos que confirmam a presença de carbapenemases, enzimas que hidrolisam o fármaco e causam resistência. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo a caracterização fenotípica e genotípica do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isolados de queijo artesanal serrano. Para o estudo foram utilizadas um total de 117 cepas de *E. coli* isoladas de leite cru (8 cepas) e Queijo Artesanal Serrano (109 cepas). As cepas foram obtidas de estudos anteriores no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do CAV- UDESC. Estas amostras eram armazenadas em freezer – 80 °C até o momento do estudo. Antes da realização dos testes eram inoculadas em caldo BHI e incubadas por 24 horas à 37°C para recuperação das bactérias, após isoladas em ágar TSA e confirmadas com testes bioquímicos. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados foram realizados de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), pelo teste de difusão em disco, usando placas de Ágar Muller-Hinton e os antimicrobianos: AMC (amoxicilina-clavulanato; 20/10ug), ATM (aztreonam; 30ug), CPM (cefepime; 30ug), CAZ (ceftazidime; 30ug), CRO (ceftriaxone; 30ug), CTX (cefotaxime; 30ug), MER (meropenem; 10ug), IPM (imipenem; 10ug), CFO (cefxitin; 30ug), AMP (ampicilina; 10ug), TET (tetraciclina; 30ug), DOX (doxaciiclina; 10ug), CIP (ciprofloxacina; 5ug), NOR (norfloxacina; 10ug), LVX (levofloxacina; 5ug), TOB (tobramicina; 10ug), GEN (gentamicina; 10ug), AMI (amicacina; 30ug), EST (estreptomina; 10ug), CLO (cloranfenicol; 30ug), SUT (trimetoprim; 23.75 ug) e NIT (nitrofurantoin; 300ug). Em cada placa foi analisada uma cepa de *E. coli*, nas quais, após 24 horas na estufa a 37°C, apresentou diferentes halos de inibição frente aquele grupo de antimicrobianos, tais halos foram medidos e

interpretados para classificarmos as bactérias como sensíveis ou resistentes. Outro método utilizado foi a caracterização do fenótipo e genótipo das cepas isoladas, de forma a identificar aquelas produtoras de ESBL ou resistentes à carbapenemos. Para ESBL foi usada a difusão em disco, em placas de Ágar Muller-Hinton, posicionando um disco de AMC no centro e outros discos de beta-lactâmicos à 30mm do disco central, após incubação, foram consideradas produtoras de ESBL aquelas cepas que apresentaram aumento da área de inibição ou formação de “phantom zone”, com distorção da área de inibição ao redor dos discos beta-lactâmicos. As cepas que apresentaram fenótipo de produção de ESBL foram posteriormente submetidas à Multiplex-PCR para caracterização do genótipo, utilizando os primers MultiTSO-T_for, MultiTSO-T_rev, MultiTSO-S_for, MultiTSO-S_rev, MultiCTXMGp1_f, MultiCTXMGp1-2r, MultiCTXMGp2_f, MultiCTXMGp9_f, MultiCTXMGp_r, para detectar a presença dos genes *blaTEM*, *blaOXA*, *blaSHV*, *blaCTX-M* e *blaCTX-M-3*, para produção de ESBL. Já na caracterização de resistência à carbapenemicos foram usadas placa de Ágar Muller- Hinton com suplementações diversas para cada tipo bacteriano. Nas placas colocamos meropenem e imipenem e os resultados foram avaliados a partir do diâmetro das zonas de inibição. Após a caracterização fenotípica, tais amostras foram submetidas à Multiplex- PCR para caracterização genotípica daquelas resistentes à carbapenemicos, utilizando o par de primers de sequência f-5’ GCTTGATCGCCCTCGATT 3’ e r-5’GATTTGCTCCGTGGCCGAAA 3’, para detectar a presença do gene *blaOXA-48-LIKE*. Como resultado desse estudo, identificamos a presença de *E.coli* em diversas amostras de leite cru e de queijo artesanal serrano, sendo esse um grande indicativo de falta de higiene e medidas sanitárias adotadas pelos produtores, não apenas na coleta do leite, mas também na produção do queijo. O perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos apontou que 52.99% das cepas isoladas apresentaram-se sensíveis aos antimicrobianos testados, sendo que 8.55% apresentaram perfil de multirresistência e 17.95% apresentaram resistência à apenas duas classes deles. A investigação da produção de ESBL pelas cepas isoladas nos mostrou que 3.42% das bactérias testadas o produzem de fato, as quais, inclusive, apresentaram multirresistência no método anterior, gerando grande preocupação já que os beta-lactâmicos continuam sendo os antimicrobianos mais utilizados contra bactérias Gram-negativas, além disso, através do Multiplex-PCR, foi constatado que o gene mais abundante dentre os isolados positivos para ESBL, foi o *blaTEM*. Por outro lado, todas as cepas isoladas apresentaram-se negativas em relação à resistência contra carbapenemos, não havendo presença do gene *blaOXA-48* no Multiplex-PCR. Os resultados desse estudo alertam para um grande problema para a saúde pública, já que tais contaminantes apresentam riscos à saúde do consumidor, por tal razão, faz-se necessária a intensificação e fiscalização do manejo sanitário em todas as etapas da produção do Queijo Artesanal Serrano, além de continuas análises laboratoriais para detecção de microrganismos em amostras desses produtos.

Palavras-chave: *E. coli* diarreio genica. Multirresistência. ESBL.